

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Numéro de publication:

0 403 377
A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 90401636.7

(51) Int. Cl.⁵: C08B 37/00, A61K 31/715

(22) Date de dépôt: 13.06.90

(30) Priorité: 14.06.89 FR 8907857

(43) Date de publication de la demande:
19.12.90 Bulletin 90/51

(84) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: INSTITUT FRANCAIS DE
RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA
MER (IFREMER)
66 avenue d'Iéna
F-75116 Paris(FR)

(72) Inventeur: Collec, Sylvia
129, Boulevard Ney
F-75018 Paris(FR)
Inventeur: Bretaudiere, Jacqueline
208, rue de Vaugirard
F-75015 Paris(FR)
Inventeur: Durand, Patrick
61, rue de la Commune de 1871
F-44400 Reze(FR)
Inventeur: Fischer, Anne-Marie
15, Passage Trubert-Bellier
F-75013 Paris(FR)
Inventeur: Jozefonvicz, Jacqueline
65, Deuxième Avenue
F-60260 Lamorlaye(FR)
Inventeur: Kloareg, Bernard
81, rue de la Rive
F-29250 Saint-Pol-de Leon(FR)
Inventeur: Vidal, Catherine
66, rue des Grands Champs
F-75020 Paris(FR)

(74) Mandataire: Ores, Irène et al
CABINET ORES 6, Avenue de Messine
F-75008 Paris(FR)

EP 0 403 377 A1

(54) Polysaccharides sulfatés, agent anticoagulant et agent anti-complémentaire obtenus à partir de fucanes d'algues brunes et leur procédé d'obtention.

(57) La présente invention est relative à des polysaccharides sulfatés obtenus à partir de fucanes extraits de Phéophycées.

Le poids moléculaire de ces polysaccharides est supérieur à 5 et inférieur à 40 Kda ; leur teneur en soufre est supérieure à celle du fucane d'origine et ils contiennent moins de 0,15 % de protéines contaminantes.

Application en tant qu'agents anticoagulants et anticomplémentaires.

POLYSACCHARIDES SULFATES, AGENT ANTICOAGULANT ET AGENT ANTICOMPLEMENTAIRE OBTENUS A PARTIR DE FUCANES D'ALGUES BRUNES ET LEUR PROCEDE D'OBTENTION.

La présente invention est relative à de nouveaux polysaccharides sulfatés, obtenus par lyse ménagée des fucanes extraits des Phéophycées (algues brunes), à leur procédé d'obtention, ainsi qu'à un nouvel agent anticoagulant et antithrombotique et un nouvel agent anticomplémentaire.

L'effet anticoagulant est défini comme l'inhibition de la formation de thrombine active dans le plasma, alors que l'effet antithrombotique est défini comme l'inhibition de la formation du *thrombus* et/ou de sa croissance.

Le médicament anticoagulant le plus utilisé actuellement est l'héparine, qui est un polysaccharide sulfaté constitué d'unités glucosamine et acide glucuronique liées en 1-4, dans lesquelles les groupes sulfate sont présents sur la fonction amine de la glucosamine, et/ou sur des fonctions alcool de la glucosamine et de l'acide uronique. L'héparine agit sur la coagulation en potentialisant l'action anticoagulante de deux inhibiteurs plasmatiques. Le premier qui est l'antithrombine III (AT III) agit à la fois sur la thrombine (également connue sous le nom de facteur IIa) et sur le facteur X activé (ou facteur Xa) ; le second, appelé deuxième cofacteur de l'héparine (HC II), agit sur le facteur IIa, et non sur le facteur Xa.

En outre, en ce qui concerne la prévention des thromboses, on utilise de plus en plus des héparines de bas poids moléculaire, obtenues par dépolymérisation ; leur action sur la coagulation globale est faible ; elles n'ont par exemple aucun effet, in vitro, sur le temps de céphaline kaolin (TCK), qui explore de façon globale la coagulation plasmatique par la voie endogène, c'est-à-dire l'ensemble des facteurs plasmatiques à l'exception du facteur VII et des facteurs plaquettaires ; en revanche, elles permettent, in vivo, la prévention des thromboses expérimentales. Il a été montré qu'elles potentialisaient l'activité inhibitrice de l'AT III vis-à-vis du facteur Xa, et qu'elles étaient faiblement actives vis-à-vis du facteur IIa. Toutefois, il semble de plus en plus probable qu'elles exercent essentiellement leur action dans la prévention des thromboses, par leur faible activité anti-IIa résiduelle.

L'héparine est également connue pour ses propriétés anticomplémentaires. Le système du complément est un ensemble de protéines plasmatiques ou membranaires qui jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de défense immunitaire. Il intervient dans la défense de l'organisme (destruction des agents infectieux, élimination des complexes immuns) et dans des processus pathologiques de type inflammatoire. Dans le sang il est en outre responsable de l'hémolyse ou lyse des globules rouges.

Les protéines du complément se trouvent sous forme inactivée dans le sérum. Leur activation se fait selon un ordre déterminé selon deux séquences, la voie alterne et la voie classique. L'activation de la voie alterne repose sur un mécanisme non spécifique de reconnaissance de la surface cible (bactérie, virus, parasite, cellule tumorale). L'activation de la voie classique repose sur la reconnaissance spécifique de la cible par un anticorps. Dans la voie alterne, la phase initiale est amorcée par la fixation d'un produit de clivage du C3, le C3b, et la libération du C3a, anaphylatoxine responsable de réactions inflammatoires. Le C3b se fixe ainsi par liaison covalente avec des groupements hydroxyles et aminés de la surface. Une fois lié, il peut fixer le facteur B et après activation de ce dernier par le facteur D, il forme la C3 convertase alterne. Dans la voie classique, la phase initiale est amorcée par l'activation du C1 qui s'effectue principalement au niveau d'un complexe antigène-anticorps. Après activation du C1, les composants C4 et C2 sont à leur tour activés et vont former sur la surface un complexe enzymatique, la C3 convertase classique. L'activation du C4 est analogue à celle du C3 avec libération du C4b et C4a. Le C4b se fixe de manière covalente avec le même type de groupements chimiques que le C3b.

L'héparine agit comme inhibiteur de l'activation du complément par son interaction avec les C3 convertase. Il a été montré que cette activité anticomplémentaire de l'héparine est totalement indépendante de son activité antithrombotique et qu'elle est liée à la présence sur la fonction amine d'un groupe sulfate ou acétyle, contrairement à l'activité anticoagulante qui n'est pas observée si le substituant de la fonction amine n'est pas un groupe sulfate. Il apparaît également que la présence d'un groupe sulfate sur une des fonctions alcool de l'acide uronique joue un rôle important dans l'activité anticomplémentaire. [KAZATCHINE et al. ; J. Clin. Invest. ; 67, (1981)].

D'autres polysaccharides sont également connus pour leurs propriétés anticoagulantes et/ou antithrombotiques ; il s'agit, par exemple, des dermatanes sulfates, dont l'activité anticoagulante, comparée à celle de l'héparin, est faible, mais dont l'activité anti-thrombotique est équivalente. Ils agissent en inhibant la thrombine, par la potentialisation de l'effet inhibiteur du cofacteur HC II ; en revanche ils n'agissent pas par l'intermédiaire du cofacteur AT III, et sont sans effet sur le facteur Xa.

Le pentosane polysulfate, largement utilisé dans la prévention des thromboses, agit également en catalysant l'inhibition de la thrombine par l'HC II.

En revanche ces polysaccharides ne présentent pas d'activité anticomplémentaire comparable à celle de l'héparine ; KAZATCHINE et al. ont montré, dans la publication citée plus haut, que le dermatane sulfate, dans lequel la fonction amine de la galactosamine est acétylée mais dont les fonctions alcool de l'acide uronique ne sont pas sulfatées, est, sur ce plan, quatorze fois moins actif que l'héparine.

5 Les fucanes sont des polysaccharides sulfatés, de poids moléculaire moyen élevé (100 à 800 kDa), extraits des thalles d'algues brunes. Ce sont des polymères d' α -1,2-L-fucose-4-sulfate pouvant contenir également du D-xylose, du D-galactose et des acides uroniques. Les acides uroniques des fucanes ne sont pas sulfatés, contrairement à ceux de l'héparine. En outre, les fucanes diffèrent à la fois de l'héparine et du dermatane sulfate, en ce qu'ils ne contiennent pas d'amino-sucres.

10 Des travaux réalisés sur les fucanes bruts, ont permis de séparer, à partir d'un même extrait brut, diverses sous-populations de fucanes, différant les uns des autres par leur poids moléculaire moyen, d'une part, et par leurs propriétés physico-chimiques d'autre part.

En fait, ces travaux, utilisant des procédés non agressifs de fractionnement (précipitation fractionnée, filtration sur gel, etc...) qui ne dégradent pas le squelette polysaccharidique des molécules de fucanes ont mis en évidence l'existence de sous-populations naturelles de fucanes.

15 Les propriétés anticoagulantes des fucanes bruts ont été démontrées dès 1957 par SPRINGER et al. et confirmées depuis lors par de nombreux auteurs [BERNARDI et SPRINGER, *The Journal of Biological Chemistry*, 237.1, (1962) ; MORI et al., *Marine Algae in Pharmaceutical Science*, 2, 1982].

Une étude réalisée par les inventeurs, sur le mécanisme de l'action du fucane brut sur la coagulation, a montré que le fucane brut allonge le temps de céphaline kaolin (TCK), et surtout le temps de thrombine (TT) (qui explore la transformation du fibrinogène en caillot de fibrine sous l'influence de la thrombine, dernière phase de la coagulation). Cette étude montre également que le fucane brut agit quasi-exclusivement sur la thrombine (facteur IIa), et ce principalement en potentialisant l'effet de l'inhibiteur HCII (à même concentration que l'héparine), et celui de l'antithrombine III (à des concentrations 30 fois supérieures à celles de l'héparine). En revanche, le fucane n'a, contrairement à l'héparine, aucune activité anti-Xa.

25 Des observations similaires ont été faites par d'autres auteurs [CHURCH et al. *The Journal of Biological Chemistry* ; 264.6 (1989)] qui ont également étudié les propriétés du fucane brut. Ces auteurs ont montré que le fucane brut catalyse faiblement l'inhibition de la thrombine par l'AT III, et fortement l'inhibition de la thrombine par l'HC II.

30 Les fucanes pourraient donc constituer une nouvelle catégorie de médicaments anticoagulants originaux, de par leur mécanisme d'action qui diffère de celui des anticoagulants connus. En effet, ils potentialisent l'activité inhibitrice de l'HC II, et également celle de l'AT III vis-à-vis de la thrombine, contrairement au dermatane sulfate qui potentialise exclusivement l'activité inhibitrice de l'HC II. En revanche, les fucanes, comme le dermatane sulfate et contrairement à l'héparine, n'ont aucun effet sur l'inhibition du facteur Xa ; ils sont des inhibiteurs exclusifs de la thrombine. Les Inventeurs ont également constaté que, de façon surprenante, les fucanes, bien qu'ils ne contiennent (contrairement à l'héparine) ni amino-sucres, ni acides uroniques O-sulfatés, ont la propriété d'inhiber l'activation du complément.

35 Les inhibiteurs de l'activation du complément peuvent jouer un rôle dans la prévention des phénomènes de rejet des greffes ; leur utilisation a également été suggérée dans le traitement des dialysés rénaux et des convalescents d'infarctus du myocarde. L'activité anticomplémentaire peut également être mise à profit pour inhiber l'activation du complément dans les dispositifs de circulation extra-corporelle.

40 Bien que leurs propriétés anticoagulantes soient connues depuis de longues années, les fucanes bruts n'ont pas été utilisés en thérapeutique, d'une part à cause de leur teneur en protéines résiduelles relativement élevée, qui risque de provoquer des phénomènes immunogènes, et d'autre part, à cause de leur masse moléculaire élevée qui a pour conséquence une mauvaise solubilité, ce qui limite considérablement leur utilisation à de fortes concentrations.

45 Or, les études réalisées jusqu'à présent sur l'action anticoagulante des fucanes, en particulier celles qui concernaient l'activité anticoagulante des diverses sous-populations de fucane obtenues par fractionnement du fucane brut, suggéraient que l'activité anticoagulante était précisément liée à la grande taille des molécules de fucane. Certaines équipes sont parvenues à la conclusion que l'activité anticoagulante était en relation avec un poids moléculaire élevé. [USUI et al. *Agr., Biol. Chem.*, 44-8, (1980)].

50 D'autres travaux s'accordent à mettre en évidence l'existence d'une limite inférieure de 20 kDa au-dessous de laquelle aucune activité anticoagulante significative n'a été observée. L. Brevet Anglais 890 207 décrit par exemple l'obtention de 7 fractions différentes, dont les poids moléculaires s'échelonnent entre 5 t 50 000, par précipitation fractionnée à l'éthanol du fucane brut. S. lon c Br vet, parmi ces fractions, seules celles dont le poids moléculaire est supérieur à 20 000 présentent une activité anticoagulante intéressante.

NISHINO et al. [*Carbohydrate Research*, 186 (1989), 119-129] ont étudié les propriétés anticoagulantes

des fractions obtenues à partir de fucanes non dégradés et ont également mis en évidence cette limite de 20 kDa ; en outre, les fractions purifiées décrites dans leur publication ont un mécanisme d'action différent de celui décrit pour des fucanes bruts, car, bien que comme ces derniers, elles semblent être plus actives sur la thrombine que sur le facteur Xa, leur action se manifeste essentiellement au niveau du mécanisme global de la coagulation, ce qui se traduit par un allongement du temps de céphaline kaolin (TCK) ; en revanche, elles n'ont que peu d'effet sur le temps de thrombine, et paraissent donc moins actives au niveau de la dernière phase de la coagulation.

Il apparaît donc que les sous-populations polysaccharidiques obtenues jusqu'alors par fractionnement non-dégradatif du fucane brut ont une action sur la coagulation variable d'une sous-population à une autre, et pouvant être, semble-t-il, différente de celle observée dans le cas du fucane brut ; d'autre part, il ressort des travaux réalisés jusqu'à présent que les fractions de masse moléculaire inférieure à 20 kDa, qui seraient particulièrement avantageuses pour leur solubilité, sont quasiment inactives sur la coagulation.

Les Inventeurs ont émis l'hypothèse qu'en fragmentant les longues chaînes polysaccharidiques du fucane brut, il serait possible d'obtenir des fractions de faible poids moléculaire ; toutefois, la coupure du squelette saccharidique des molécules de fucane nécessite la mise en oeuvre de procédés de lyse qu'il est nécessaire de pouvoir contrôler pour ne pas aboutir à une dégradation trop poussée du fucane, entraînant la perte de ses propriétés.

Les essais déjà effectués en ce sens n'avaient pas permis de mettre au point un procédé de dégradation des fucanes donnant des fractions de poids moléculaire intermédiaire ; en effet, les procédés utilisés aboutissaient soit à une dégradation insuffisante, donnant des fractions de poids moléculaire supérieur à 40 kDa, soit à une dégradation quasi-totale, donnant des fragments dépourvus d'activité anticoagulante. [V. COLLIEC et al., IVèmes Journées d'hémostase et de thrombose, Paris, Mars 1988], [FISCHER et al., International Congress on thrombosis (Athens), Mai 1988], [COLLIEC et al., Polymers in Medicine, Varsovie, Octobre 1988].

La présente invention a en conséquence, pour but de pourvoir à des fractions polysaccharidiques de poids moléculaire relativement faible obtenues par lyse ménagée à partir des fucanes d'algues brunes ; elle a également pour but de pourvoir à des agents anticoagulants et antithrombotiques particulièrement intéressants en ce que leur activité s'exerce par inhibition du facteur IIa et en ce qu'ils ne possèdent pas d'activité anti-Xa, et qu'ils ne présentent pas les effets secondaires dus au poids moléculaire élevé et à la haute teneur en protéines résiduelles des fucanes bruts, et qui sont en outre obtenus à partir des algues brunes qui sont des matières premières disponibles aisément en grande quantité. Elle a également pour but de pourvoir à un nouvel agent anticomplémentaire obtenu à partir des fucanes d'algues brunes.

La présente invention a pour objet des polysaccharides sulfatés obtenus à partir des fucanes de Phéophycées, caractérisés en ce que leur poids moléculaire, déterminé par filtration sur gel par rapport à un étalon polysaccharidique, est supérieur à 5 et inférieur à 40 kDa, en ce que leur teneur en soufre est supérieure à celle du fucane d'origine, en ce qu'ils contiennent moins de 0,15% de protéines contaminantes et en ce qu'ils sont plus solubles que les fucanes d'origine, et en ce qu'ils possèdent des propriétés anticoagulantes et antithrombotiques.

Des polysaccharides sulfatés conformes à l'invention sont susceptibles d'être obtenus par lyse ménagée d'un fucane brut extrait de Phéophycées.

Selon un mode de réalisation préféré des polysaccharides sulfatés conformes à l'invention, leur poids moléculaire moyen est inférieur ou égal à 20 kDa.

Selon un autre mode de réalisation préféré des polysaccharides sulfatés conformes à l'invention, leur poids moléculaire moyen est compris entre 20 et 35 kDa.

Selon un mode de réalisation également préféré des polysaccharides sulfatés conformes à l'invention, leur teneur en soufre est supérieure de 2% à 20% à celle des fucanes d'origine.

Selon une disposition particulièrement avantageuse de ce mode de réalisation, les polysaccharides sulfatés sont obtenus par hydrolyse acide ménagée à partir des fucanes extraits de *Fucus vesiculosus*, leur teneur en soufre est supérieure d'environ 15% à 20% à celle des fucanes d'origine et leur teneur en protéines est inférieure à 0,05%.

Selon une autre disposition particulièrement avantageuse de ce mode de réalisation, les polysaccharides sulfatés sont obtenus par hydrolyse acide ménagée à partir des fucanes extraits de *Ascophyllum nodosum*, leur teneur en soufre est supérieure d'environ 2% à 5% à celle des fucanes d'origine et leur teneur en protéines est inférieure à 0,05%.

Selon une autre disposition particulièrement avantageuse de ce mode de réalisation, les polysaccharides sulfatés sont obtenus par hydrolyse acide ménagée à partir des fucanes extraits de *Pelvetia canaliculata*, leur teneur en soufre est supérieure d'environ 15% à 20% à celle des fucanes d'origine et leur teneur en protéines est inférieure à 0,05%.

Selon encore une autre disposition particulièrement avantageuse de ce mode de réalisation, les polysaccharides sulfatés sont obtenus par hydrolyse acide ménagée à partir des fucanes extraits de *Undaria pinnatifida*, leur teneur en soufre est supérieure d'environ 10% à 15% à celle des fucanes d'origine et leur teneur en protéines est inférieure à 0,05%.

5 Les Inventeurs ont démontré, in vitro et in vivo, que les polysaccharides sulfatés conformes à l'invention possédaient à la fois des propriétés anticoagulantes et antithrombotiques. Contrairement aux sous-populations polysaccharidiques de faible poids moléculaire décrites par NISHINO et al., les polysaccharides conformes à l'invention agissent essentiellement au niveau de la dernière phase de la coagulation.

La présente invention a également pour objet un agent anticoagulant et antithrombotique, actif aussi bien in vitro qu'in vivo, activateur des co-facteurs HCII et AT III, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un polysaccharide sulfaté tel que défini plus haut.

La présente invention a en outre pour objet un procédé d'obtention des polysaccharides sulfatés tels que définis plus haut, caractérisé en ce que l'on procède à une lyse ménagée d'un fucane brut issu de Phéophycées, en ce que l'on fractionne le lysat obtenu par filtration sur gel, et en ce que l'on recueille des fractions de poids moléculaire supérieur à 5 et inférieur à 40 kDa.

15 Selon un mode de mise en oeuvre préféré du procédé selon la présente invention, la lyse ménagée du fucane est réalisée par hydrolyse acide.

Selon une disposition particulièrement avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, l'hydrolyse acide est effectuée par l'action de H_2SO_4 0,5 à 1N, à une température comprise entre 40° et 50° C, pendant 1 à 20 4 heures.

Selon un autre mode de mise en oeuvre préféré du procédé selon la présente invention, la lyse ménagée du fucane est réalisée par radiolyse, en soumettant le fucane à une irradiation, notamment par rayons gamma.

Selon encore un autre mode de mise en oeuvre préféré du procédé selon la présente invention, la lyse ménagée du fucane est réalisée par hydrolyse enzymatique. Ce mode de mise en oeuvre implique l'utilisation d'au moins une enzyme capable de fragmenter le squelette hydrocarboné du fucane, par exemple une enzyme du type α -1-2-fucosidase ; des mélanges d'enzymes, qui sont par exemple constitués par des sucs digestifs de mollusques marins ou obtenus à partir de ceux-ci, ou encore par des enzymes contenues dans des bactéries qui dégradent les algues, peuvent également être utilisés.

30 Selon encore un autre mode de mise en oeuvre préféré du procédé selon la présente invention, la lyse ménagée du fucane est réalisée par des procédés physiques, notamment par sonication.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à l'invention, on recueille les fractions dont le poids moléculaire est inférieur ou égal à 20 kDa.

Le poids moléculaire des polysaccharides sulfatés conformes à la présente invention autorise leur solubilisation, même à concentration élevée, dans le plasma et dans les solutions injectables. En outre, ils contiennent, par rapport aux fucanes bruts un faible pourcentage de protéines contaminantes. Il est donc possible d'utiliser ces produits chez l'homme comme médicaments. Ceci est particulièrement avantageux dans certaines applications des propriétés anti-thrombotiques des polysaccharides sulfatés conformes à l'invention, en particulier dans la prévention des thromboses veineuses par injection sous-cutanée d'un antithrombotique ; cette application demande l'utilisation de solutions relativement concentrées, ce qui était impossible avec les fucanes non fractionnés ; il est également envisageable d'utiliser les polysaccharides sulfatés conformes à l'invention par voie orale et transdermique.

40 Les fractions d'un poids moléculaire compris entre 5 et 100 kDa, obtenues à partir des fucanes, possèdent en outre une activité anticomplémentaire égale ou supérieure à celle des fucanes non fractionnés.

45 La présente invention a donc également pour objet un agent inhibiteur de l'activation du complément, caractérisé en ce qu'il comprend des fucanes extraits de Phéophycées et/ou leurs fractions.

Selon un mode de réalisation préféré de l'agent inhibiteur de l'activation du complément conforme à la présente invention, il comprend une fraction de poids moléculaire supérieur à 50 kDa, obtenue à partir d'un fucane extrait de Phéophycées.

50 Selon un mode de réalisation préféré de l'agent inhibiteur de l'activation du complément conforme à la présente invention, il comprend une fraction de poids moléculaire moyen compris entre 5 et 50 kDa, obtenue à partir d'un fucane extrait de Phéophycées.

Selon encore un mode de réalisation préféré de l'agent inhibiteur de l'activation du complément conforme à la présente invention, il comprend des polysaccharides sulfatés tels que définis plus haut.

55 La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, et qui se réfère à des exemples d'obtention de polysaccharides sulfatés conformes à la présente invention à partir de fucanes extraits de différentes algues brunes, et à la démonstration des activités de ces

polysaccharides.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

6

I - OBTENTION DE FRACTIONS POLYSACCHARIDIQUES SULFATEES CONFORMES A L'INVENTION

10

Exemple 1 : Fractionnement des fucanes et purification des fractions obtenues

A) Extraction de fucanes d'algues brunes.

15

Les fucanes sont extraits à partir du matériel pariétal des thalles d'algues brunes, par une procédure classique d'extraction organique. Cette procédure est dérivée de la procédure de BLACK et al., [J. Sci. Food Agric. (1952)].

20

Le protocole d'extraction peut être schématisé comme suit : les thalles sont broyés dans l'éthanol absolu contenant 5% en poids de formol. Le broyat obtenu est soumis à une première extraction, par l'éthanol à 95 % contenant 5% en poids de formol, puis à une deuxième extraction par un mélange acétone/toluène 2/1 (V/V). Après séchage à l'étuve, le matériel obtenu est soumis à une ou plusieurs extractions acides par HCl 0,01 M contenant 2% en poids de CaCl_2 .

25

Après neutralisation par la soude, l'extrait acide est traité au chlorure de N-cétylpyridinium qui forme un complexe avec les fucanes les plus sulfatés, et permet donc d'enrichir la préparation en ces derniers. Le précipité obtenu est ensuite redissous dans une solution de CaCl_2 3M, puis lyophilisé.

B) Fractionnement des fucanes extraits.

30

1ère étape : dégradation de l'extrait brut.

a) par hydrolyse acide

35

L'extrait acide est dissous à 10 mg/ml dans une solution d' H_2SO_4 1N et la température fixée à 45° C. La dégradation suivie par viscosimétrie, (viscosimètre de type Ubbelohde de diamètre de capillaire d'écoulement de 0,5 mm) est arrêtée par ajout de soude (NaOH M) avant l'hydrolyse totale du fucane. Au cours de la dégradation, la viscosité spécifique réduite (η_{spec}/c) est calculée toutes les 30 minutes. La solution d'extrait acide dégradé est concentrée, ultrafiltrée en utilisant une membrane ayant un seuil de coupure de 1000 daltons et enfin lyophilisée.

40

b) par radiolyse

45

L'hydrolyse radiochimique est réalisée sous irradiation à partir d'une source de cobalt 60 de 60.000 Ci. Les fucanes bruts sont irradiés à température ambiante pendant 92 heures avec un débit de dose de 2081 rads/minute soit une dose d'irradiation de 11,5 Mrads pour tous les échantillons.

60

c) Dégradation enzymatique

55

La dégradation enzymatique de l'extrait brut de *Pelvetia canaliculata* par des extraits bruts de suc digestif d'haliotide (*Haliotis tuberculata*) et d'aplysie (*Aplysia californica*) est réalisée comme suit : le fucane brut est dissous à une concentration de 10 mg/mL dans du tampon citrate phosphate ; pH 5,8 (acide citrique = $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ à 0,1 M et disodium hydrogénophosphate = $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à 0,2 M). La solution de fucane est chauffée à 37° C et 200 μL d'extrait digestif sont ajoutés toutes les heures, pour assurer une concentration constante d'enzyme active. La dégradation est suivie par viscosimétrie, la viscosité spécifique réduite, (η_{sp}/C), est calculée lors des différents prélèvements. La réaction est arrêtée par addition d'une

solution de carbonate disodique (Na_2CO_3) 0,2 M.

2ème étape : fractionnement préparatif de l'extrait brut dégradé

5

a) à l'échelle du laboratoire

500 mg de lyophilisat repris dans 5 ml de NaCl 0,2 M sont déposés sur une colonne (hauteur 35 à 45
10 cm x 4,8 cm) de gel de fractionnement, (SEPHACRYL S-200 ou S-300). Le débit linéaire est de 3,33
cm/heure. Une double détection est réalisée à la sortie de la colonne à l'aide d'un réfractomètre différentiel
et d'un détecteur UV à 280 nm. La colonne a été calibrée à l'aide d'étalons polysaccharidiques. Les
signaux sont enregistrés sur un enregistreur double voie. Après étude des chromatogrammes, les différen-
tes fractions obtenues à la sortie de la colonne (5 ml) sont réunies en 3 ou 4 fractions. Chaque fraction est
15 concentrée, ultrafiltrée sur une membrane ayant un seuil de coupure de 10 000 daltons pour la première
fraction, et une membrane de seuil de coupure de 1 000 daltons pour les autres fractions, et lyophilisée.

b) à l'échelle semi-pilote

20

30 g de lyophilisat repris dans 125 ml de NaCl 0,2 M sont déposés sur une colonne de SEPHACRYL S-
200 (hauteur 60 cm x diamètre 11,3 cm), le débit linéaire est de 15 cm/heure. Une double détection est
réalisée à la sortie de la colonne, à l'aide d'un réfractomètre différentiel et d'un détecteur UV à 280 nm. Les
signaux sont enregistrés sur un enregistreur double voie. Après étude des chromatogrammes, les différen-
25 tes fractions obtenues à la sortie de la colonne (30 ml) sont réunies en 3 ou 4 fractions. Chaque fraction est
concentrée, ultrafiltrée sur une membrane ayant un seuil de coupure de 10 000 daltons pour la première
fraction, et une membrane de seuil de coupure de 1000 daltons pour les autres fractions, et lyophilisée.

La figure 1 représente le fractionnement préparatif sur gel SEPHACRYL S-200 (domaine de fractionne-
ment 250×10^3 à 5×10^3 daltons) de l'extrait acide de fucane dégradé par H_2SO_4 1N à 45°C : A_1 = 1ère
30 fraction ($\text{PM} > 20\text{kDa}$) ; A_2 = 2ème fraction ($20\text{kDa} > \text{PM} > 10\text{kDa}$) ; A_3 = 3ème fraction ($\text{PM} < 10\text{kDa}$) ; V_m =
volume mort et V_t = volume total. La courbe en pointillés (---) représente la quantité de matériel élué
mesurée par réfractométrie différentielle. La courbe en trait plein (—) représente la quantité de
protéines mesurée par absorption UV à 280 nm.

35

Exemple 2 : Caractérisation physico-chimique des fractions obtenues

Spectre Infra-rouge :

40

La figure 2 représente les spectres infra-rouge du fucane brut (2a) extrait des parois de *Fucus*
vesiculosus, et d'une fraction A_2 (2b) de poids moléculaire moyen 13×10^3 obtenue par hydrolyse acide
ménagée de cet extrait acide. Le pic à 1240 cm^{-1} est caractéristique des groupes sulfuryle. Le pic à 850
 cm^{-1} montre que la majorité des groupes sulfate est en C_4 sur le L-Fucose ; une partie de ces groupes
45 sulfate est cependant en C_6 comme le montre l'épaulement à 820 cm^{-1} . La majeure partie des fonctions
carboxyliques sont sous forme non dissociée comme le montre le pic à 1720 cm^{-1} , comparé au faible
épaulement à 1420 cm^{-1} qui représente les fonctions carboxyliques sous forme dissociée.

Détermination du poids moléculaire :

La détermination du poids moléculaire en g/mole des fractions de fucane est réalisée en chromatogra-
phie liquide haute performanc analytique (HPLC) sur une colonne Si-Diol 500 (domaine de fractionnement
5000 à 10^6 daltons) par injection de 50 μl de polysaccharides étalons (Pullulane des laborator s
55 POLYMER LABORATORIES LTD.) ou de la fraction de fucane étudiée, à 2 mg/ml dans du NaCl 0,2 M, le
débit étant de 1 ml/mn et la détection réalisée par réfractométrie. Les chromatogrammes sont stockés puis
analysés grâce à un micro-ordinateur possédant un programme GPC (chromatographi d'exclusion stérique
sur gel perméable), les résultats sont enregistrés sur une imprimante.

Teneur en S et N :

La teneur en S et N des fractions de fucane est donnée en % (en poids de produit pur) par analyse élémentaire.

Teneur en protéines :

La teneur en protéines est estimée en % (en poids de produit pur), par le test colorimétrique du Bradford (test "Bio-Rad") en prenant comme référence l'albumine bovine.

Le tableau I permet d'établir une comparaison entre les propriétés physico-chimiques du fucane brut, c'est-à-dire de l'extrait acide (EA) non fractionné, et des polysaccharides sulfatés conformes à la présente invention, représentés par la fraction A₂ obtenue par hydrolyse acide à partir des fucanes bruts extraits de 4 algues brunes : (*Ascophyllum nodosum* (An), *Fucus vesiculosus* (Fv), *Pelvetia canaliculata* (Pc), *Undaria pinnatifida* (Up)).

Tableau I

Poids moléculaire		S	protéine	rendement
moyen		%	%	%
EA(An)	7 x 10 ⁵	8,9	0,36	-
A2(An)	18 x 10 ³	9,1	<0,01	57
EA(Fv)	8 x 10 ⁵	7,8	0,85	-
A2(Fv)	13 x 10 ³	9,2	<0,01	57
EA(Pc)	75 x 10 ⁴	9,4	0,19	-
A2(Pc)	18 x 10 ³	11	<0,01	40
EA(Up)	48 x 10 ⁴	7,2	0,26	-
A2(Up)	23 x 10 ³	8,0	<0,01	36

Le tableau II permet d'établir une comparaison entre les propriétés physico-chimiques de l'extrait acide (EA) non fractionné, et des polysaccharides sulfatés conformes à la présente invention, représentés par la fraction A₂ obtenue par radiolyse à partir des fucanes de 3 algues brunes : (*Ascophyllum nodosum* (An), *Fucus vesiculosus* (Fv), *Pelvetia canaliculata* (Pc)).

Tableau II

Poids moléculaire		S	protéine	rendement
Moyen		%	%	%
EA(An)	7 x 10 ⁵	8,9	0,36	-
A2(An)	17 x 10 ³	7,8	0,11	46
EA(Fv)	8 x 10 ⁵	7,8	0,85	-
A2(Fv)	17 x 10 ³	8,6	<0,01	56
EA(Pc)	75 x 10 ⁴	9,4	0,19	-
A2(Pc)	15 x 10 ³	9,7	0,10	58
EA(Up)	48 x 10 ⁴	7,2	0,26	-
A2(Up)	13 x 10 ⁴	8,0	0,11	36

II - COMPARAISON DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DES FUCANES BRUTS ET DES FRACTIONS OBTENUES PAR LYSÉ MENAGÉE DE CEUX-CI

Exemple 3 : Activité anticoagulante in vitro :

L'activité anticoagulante du fucane non dégradé et de fractions de fucane dégradé de poids moléculaire compris entre 10 et 20 kDa est évaluée par un temps de céphaline-kaolin (TCK). L'activité est donnée en unités internationales par mg de produit (UI/mg), par la relation suivante : (pente de la droite relative de la fraction de fucane/pente de la droite relative de l'héparine étalon) x activité en UI/mg de l'héparine étalon (Héparine H108 des Laboratoires CHOAY).

La pente est calculée à partir de la droite obtenue en reportant le logarithme du temps de coagulation en secondes, en fonction de la concentration en anticoagulant (concentration d'héparine 0,5 à 1 µg/ml de plasma, et de fucane 10 à 50 µg/ml).

Le tableau III permet d'établir une comparaison entre les activités anticoagulantes de l'extrait acide (EA), (ou fucane brut) et de la fraction A₂ (obtenue par hydrolyse acide) des algues brunes : *Ascophyllum nodosum* (An), *Fucus vesiculosus* (Fv), *Pelvetia canaliculata* (Pc) et *Undaria pinnatifida* (Up).

Tableau III

	Activité anticoagulante* (UI/mg)
EA(An)	4,5
A2(An)	6,6
EA(Fv)	5,0
A2(Fv)	5,8
EA(Pc)	4,0
A2(Pc)	2,0
EA(Up)	-
A2(Up)	1,3

* Activité anticoagulante déterminée en prenant pour référence une héparine étalon H108 à 173 UI/mg.

Le tableau IV permet d'analyser plus précisément l'action anticoagulante des polysaccharides sulfates conformes à l'invention en permettant la comparaison entre les effets respectifs sur le temps de Quick (TQ), le temps de céphaline kaolin (TCK), le temps de thrombine (TT), et le temps de reptilase (TR), de la fraction A₂ (Pc), et de l'héparine.

Tableau IV

F2 (PC) ($\mu\text{g/ml}$)	Temps de coagulation (secondes)			
	TQ	TCK	TT	TR
0	13	56	25	22
10	14	70	40	22
25	15	100	130	22
30	15	120	>180	21
50	15	155	>180	22
100	18	220	>180	22
Héparine ($\mu\text{g/ml}$)	TQ	TCK	TT	TR
0,25	14	85	90	22
0,5	14	120	>120	22
0,75	14	150	>120	22
1	14	>200	>120	22
5	17	>200	>120	22
10	23	>200	>120	22

Ceci montre que les polysaccharides sulfatés conformes à l'invention sont essentiellement actifs sur le temps de thrombine.

Exemple 4 : Activité anticoagulante in vivo ; influence des polysaccharides sulfatés conformes à l'invention sur les paramètres de la coagulation

L'activité anticoagulante des fractions polysaccharidiques conformes à la présente invention est évaluée sur le lapin. Une fraction de poids moléculaire moyen de 15 000 Da préparée selon le procédé d'hydrolyse acide décrit dans l'exemple 1 est injectée à des lapins de 3 kg. Les lapins sont saignés à intervalles réguliers et les paramètres de la coagulation sont évalués sur le sang prélevé, par la mesure du temps de thrombine (TT) et celle du temps de céphaline kaolin (TCK).

Le tableau V montre l'évolution des paramètres de la coagulation en fonction du temps, après injection de 0,5 ml d'une solution de polysaccharides sulfatés conformes à la présente invention (fraction A2 d'*Ascophyllum nodosum*, obtenue par hydrolyse acide), à 100 mg/ml, 40 mg/ml, 30 mg/ml, et à titre de comparaison après injection d'héparine à 2 mg/ml.

Tableau V

	Temps de prélèvement	TT (sec.)	TCK (sec.)
A ₂ (An) 100 mg/ml	0	35	23,3
	10mn	>240	115
	30mn	>240	88,4
	4h30	31	32,4
A ₂ (An) 40 mg/ml	0	48	30
	10mn	>240	73,4
	30mn	>240	58,8
	4h30	23,4	25
A ₂ (An) 30 mg/ml	0	33	25
	10mn	>300	59,2
	30mn	123,6	47
	4h30	20,3	24
Héparine	0	28,4	23
	10mn	>240	52
	30mn	>240	60
	4h30	-	-

Exemple 5 : Activité anti-thrombotique in vivo ; thrombose expérimentale

1/ Mode opératoire

Le modèle de thrombose expérimentale utilisé est celui de WESSLER et HAUPTMANN [STANFORD WESSLER, STANLEY M. REIMER and MINDEL C. SHEPS - J. Appl. Physiol (1959) 14 p 943-946] chez le lapin, qui utilise le facteur Xa J. HAUPTMANN, B. KAISER, F. MARKWARDT and G. NOUAK -Thromb. Haemostasis Stuttg. 43 (1980) P. 118-123, comme agent déclenchant de la thrombose.

Les essais sont effectués avec une fraction polysaccharidique, de poids moléculaire moyen 20000 \pm 2000 obtenue par hydrolyse acide du fucane brut, comme décrit dans l'exemple 1. Le produit est injecté par voie intraveineuse aux doses de 0,150 ; 0,625 ; 1,25 ; 2,5 et 5 mg/kg, 10 min avant l'induction de la thrombose. Chaque dose est testée sur 5 lapins. Une détermination de la DE50 (Dose Efficace 50, correspondant à la dose qui diminue de 50% le poids du thrombus formé) antithrombotique a été faite par régression logarithmique, et fait apparaître une valeur moyenne de 0,40 mg/kg (comprise entre 0,23 et 0,66 mg/kg).

Le prélèvement de sang est effectué 10 minutes après l'injection par voie intraveineuse juste après la création du sac veineux. Les résultats moyens obtenus pour chaque dose sont résumés dans le tableau VI.

Tableau VI

Dose injectée (mg/kg)	TCK ^a (sec)	TT ^b (sec)	TQ ^c (sec)
0	30,6	20,4	8,5
0,150	31,8	22,2	8,5
0,625	35	24,9	8,7
1,25	40,2	38,5	8,6
2,5	50,9	45,2	8,5
5	67,6	71,2	8,4
Témoins	28,8	21,4	8,3

a) Temps de céphaline kaolin

b) Temps de Thrombine

c) Temps de Quick

Ces résultats confirment ceux observés in vitro et reportés à l'exemple 3 et dans le tableau IV

Les résultats observés sur des lapins témoins soumis au protocole de thrombose expérimentale, mais n'ayant reçu que le solvant de la fraction A₂, sont également indiqués dans ce tableau. Les poids moyens des thrombi humides prélevés dans la veine contrelatérale, pour des doses de 0,15 ; 0,625 ; 1,25 et 5 mg/kg sont indiqués dans le tableau VII.

Tableau VII

Dose (mg/kg)	5	1,25	0,625	0,15	Témoins
Poids du Thrombus (mg)	0,0	0,0	23,5	40	76,9

Exemple 6 : Détermination de l'activité anticomplémentaire globale des fucanes et de leurs fractions.

L'activité anticomplémentaire est déterminée par dosage du CH50 (complément hémolytique 50), en présence ou en l'absence de fucanes. Le dosage du CH50 permet d'apprécier l'activité fonctionnelle globale de la voie classique du système du complément du sérum humain. Ce test consiste à déterminer la plus petite quantité de sérum humain fraîchement recueilli capable d'entraîner la lyse de 50 % d'un nombre donné de globules rouges de mouton sensibilisés de façon optimale par des anticorps de lapin antiglobules rouges de mouton (Es = Erythrocytes sensibilisés).

Les protéines de la voie classique du système du complément reconnaissent ces globules rouges comme un élément étranger et s'activent par clivages successifs pour réagir sur ces globules rouges, ce qui entraîne la lyse de ceux-ci. Il est possible de déterminer les propriétés d'inhibition d'un polymère tel que l'héparine ou le fucane en dosant le CH50 en présence du polymère. La capacité d'inhibition est donnée par la concentration en mg de polymère par ml de sérum humain dilué au 1/4 capable d'inhiber 50% de la lyse des cellules, en établissant une courbe dose/réponse de la lyse des cellules en fonction de la concentration en polymère. Plus celle-ci est faible, plus l'activité anticomplémentaire du polymère est importante. Pour mesurer l'activité anticomplémentaire des fucanes, l'extrait acide (fucane brut) ainsi que des fractions de différents poids moléculaires obtenues par hydrolyse acide dudit fucane brut ont été utilisés. Les conditions expérimentales sont les suivantes :

50 µl de SHN (sérum humain normal) pur sont mélangés avec 50 µl de fucane à différentes concentrations (0,2 à 0,5 mg/ml) ; après une incubation de 30 minutes à 37 °C, 4900 µl de tampon VBS++ sont ajoutés. On obtient la solution A.

D'autre part, 0,3 à 0,8 ml de tampon VBS++ sont mélangés à 0 à 0,5 ml de la solution A, pour obtenir un volume total de 0,8 ml ; 0,2 ml d'érythrocytes sensibilisés sont ajoutés au mélange ; après une incubation de 45 minutes à 37 °C, le mélange est centrifugé pendant 10 min à 1300 g et à 4 °C, et l'on

EP 0 403 377 A1

procède à la lecture de la DO à 414 nm.

Composition du tampon VBS ⁺⁺ :	
NaCl	42,5 g
Véronal (diethyl-barbital de sodium)	1,875 g
Acide diéthyl-barbiturique	2,85 g
H ₂ O distillée qsp	1000 ml

Le pH est ajusté à 7.4 ; 20 ml de cette solution sont mélangés à 80 ml d'eau distillée : on ajoute 0,5 ml de CaCl₂ 0,03 M et 0,5 ml de MgCl₂ 0,10 M.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau VIII (2^e colonne). Les fractions de fucanes sont 3 à 100 fois plus actives que l'héparine H108 analysée dans les mêmes conditions. Cette activité est indépendante de l'activité anticoagulante.

Tableau VIII

Fractions	DI ₅₀ (CH50) (mg/ml)	DI ₅₀ C3a (mg/ml)	DI ₅₀ C4a (mg/ml)
EA An	0,035 - 0,16	nd	0,14
A ₁ An	0,26	0,070	nd
A ₂ An	1 - 1,37	0,10	0,11
A ₃ An	0,20	0,175	0,024
A ₁ Pc	0,036	nd	nd
A ₂ Pc	0,60	nd	nd
A ₂ Fv	1,95	nd	nd
A ₂ Up	1,26	nd	nd
Héparine	4	0,15	0,05

Il est ainsi montré que le fucane brut ainsi que des fractions de poids moléculaire moyen compris entre 5 et 100 kDa, inhibent totalement l'activation du complément et possèdent une activité anticomplémentaire supérieure à celle de l'héparine. En effet, alors qu'il faut dans le cas de l'héparine, 4 mg/ml de polymère pour inhiber 50 % de la lyse des cellules, il ne faut que 0,035 à 1,95 mg/ml (suivant le poids moléculaire) de fucanes bruts ou fractionnés, pour obtenir le même effet. Il a été ainsi observé que des fractions de poids moléculaire moyen 18 000 kDa, préparées comme décrit à l'exemple 1, inhibent 50% de la lyse des cellules à une concentration de 1,3 mg/ml et que des fractions de poids moléculaire moyen compris entre 5 et 10 kDa inhibent 50% de la lyse des cellules à une concentration de 0,20 mg/ml.

Exemple 7 : Mesure du C3a et du C4a par radioimmunoessai

La concentration des protéines C3a et C4a libérées en phase fluide au cours de l'activation est mesuré dans le surnageant par dosage radioimmunoessai.

L'essai s'effectue de la façon suivante à l'aide du kit de radioimmunoessai C3a-desarg 125I (commercialisé par Amersham)

50 µl de SHN pur activé par le Séphadex, sont mélangés avec 50 µl de tampon VBS + +, et 100 µl de fucane à des concentrations variables (0,1 à 5 mg/ml) ; le mélange est incubé 30 minutes à 37 °C puis centrifugé pendant 5 mn à 1700g. On prélève 160 µl de surnageant, auxquels on ajoute 10 µl d'EDTA (8,66.10⁻² M), (qui bloque l'activation du complément), puis 170 µl d'agent précipitant (fourni avec le kit de dosage) ; après une incubation de 5 minutes à température ambiante, le mélange est centrifugé pendant 2 minutes à 10 000 g, et le surnageant est dilué (1/4 à 1/512), avant de procéder au dosage RIA

L'activité de l'échantillon (DI50) est exprimée comme la quantité de fucane nécessaire pour inhiber 50% de la quantité de C3a normalement généré dans 1 ml de SHN dilué au 1/4. cette dose inhibitrice est exprimée en mg de fucane/ml de SHN dilué au 1/4. Les résultats sont reportés dans le tableau VIII (colonne

3).

Une solution de 0,21 mg/ml de A₂(An) dans du SHN dilué au 1/4 permet de diminuer l'activation du C3 en dessous de l'activation spontanée de SHN.

En outre, 0,5 mg de la même fraction suffisent à inhiber totalement l'activation du C3 contenu dans 1 ml de SHN dilué au 1/4 et soumis à un activateur (Sephadex, qui entraîne, à la concentration de 15 mg/ml une activation totale du complément) mis en quantité supérieure à celle nécessaire à une activité totale du complément.

Les résultats relatifs au C4a sont également reportés dans le tableau VIII (colonne 4).

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

15 Revendications

1°) Polysaccharides sulfatés, obtenus à partir de fucanes extraits de Phéophycées, caractérisés en ce que leur poids moléculaire, déterminé par filtration sur gel par rapport à un étalon polysaccharidique, est supérieur à 5 et inférieur à 40 kDa, en ce que leur teneur en soufre est supérieure à celle du fucane d'origine, en ce qu'ils contiennent moins de 0,15% de protéines contaminantes et en ce qu'ils sont plus solubles que les fucanes d'origine, et en ce qu'ils possèdent des propriétés anticoagulantes et antithrombotiques.

2°) Polysaccharides sulfatés selon la Revendication 1, caractérisée en ce qu'ils sont susceptibles d'être obtenus par lyse ménagée d'un fucane brut extrait de Phéophycées.

3°) Polysaccharides sulfatés selon l'une quelconque des Revendications 1 ou 2, caractérisés à ce que leur poids moléculaire moyen est inférieur ou égal à 20 kDa.

4°) Polysaccharides sulfatés selon l'une quelconque des Revendications 1 ou 2, caractérisés en ce que leur poids moléculaire moyen est compris entre 20 et 35 kDa.

5°) Polysaccharides sulfatés selon l'une quelconque des Revendications 1 à 4, caractérisés en ce que leur teneur en soufre est supérieure de 2% à 20% à celle des fucanes d'origine.

6°) Polysaccharides sulfatés selon la Revendication 5, caractérisés en ce qu'il sont obtenus par hydrolyse acide ménagée à partir des fucanes extraits de *Fucus vesiculosus*, en ce que leur teneur en soufre est supérieure d'environ 15% à 20% à celle des fucanes d'origine et en ce que leur teneur en protéines est inférieure à 0,05%.

7°) Polysaccharides sulfatés selon la Revendication 5, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par hydrolyse acide ménagée à partir des fucanes extraits de *Ascophyllum nodosum*, en ce que leur teneur en soufre est supérieure d'environ 2% à 5% à celle des fucanes d'origine et en ce que leur teneur en protéines est inférieure à 0,05%.

8°) Polysaccharides sulfatés selon la Revendication 5, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par hydrolyse acide ménagée à partir des fucanes extraits de *Pelvetia canaliculata*, en ce que leur teneur en soufre est supérieure d'environ 15% à 20% à celle des fucanes d'origine et en ce que leur teneur en protéines est inférieure à 0,05%.

9°) Polysaccharides sulfatés selon la Revendication 5, caractérisés en ce qu'il sont obtenus par hydrolyse acide ménagée à partir des fucanes extraits de *Undaria pinnatifida*, en ce que leur teneur en soufre est supérieure d'environ 10% à 15% à celle des fucanes d'origine et en ce que leur teneur en protéines est inférieure à 0,05%.

10°) Agent anticoagulant et antithrombotique, actif aussi bien in vitro qu'in vivo, activateur des co-facteurs HCII et AT III, selon l'une quelconque des Revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un polysaccharide sulfaté.

11°) Procédé d'obtention des polysaccharides sulfatés selon la Revendication 2, caractérisé en ce que l'on procède à une lyse ménagée d'un fucane brut issu de Phéophycées, en ce que l'on fractionne le lysat obtenu par filtration sur gel, et en ce que l'on recueille des fractions de poids moléculaire supérieur à 5 et inférieur à 40 kDa.

12°) Procédé selon la Revendication 11, caractérisé en ce que la lyse ménagée du fucane est réalisée par hydrolyse acide.

13°) Procédé selon la Revendication 12, caractérisé en ce que l'hydrolyse acide est effectuée par l'action de H₂SO₄ 0,5 à 1N, à une température comprise entre 40° et 50° C, pendant 1 à 4 heures.

14°) Procédé selon la Revendication 11, caractérisé en ce que la lyse ménagée du fucane est réalisée

par radiolyse, en soumettant le fucane à une irradiation, notamment par rayons gamma.

15°) Procédé selon la Revendication 11, caractérisé en ce que la lyse ménagée du fucane est réalisée par hydrolyse enzymatique.

16°) Procédé selon la Revendication 11, caractérisé en ce que la lyse ménagée du fucane est réalisée par des procédés physiques, notamment par sonication.

17°) Procédé selon l'une quelconque des Revendications 11 à 16, caractérisé en ce qu'on recueille les fractions dont le poids moléculaire est inférieur ou égal à 20 kDa.

18°) Agent inhibiteur de l'activation du complément, caractérisé en ce qu'il comprend des fucanes extraits de Phéophycées et/ou leurs fractions.

19°) Agent inhibiteur de l'activation du complément, selon la Revendication 18, caractérisé en qu'il comprend une fraction de poids moléculaire supérieur à 50 kDa, obtenue à partir d'un fucane extrait de Phéophycées.

20°) Agent inhibiteur de l'activation du complément selon la Revendication 18, caractérisé en ce qu'il comprend une fraction de poids moléculaire moyen compris entre 5 et 50 kDa, obtenue à partir d'un fucane extrait de Phéophycées.

21°) Agent inhibiteur de l'activation du complément selon l'une quelconque des Revendications 1 à 9, caractérisé en qu'il comprend des polysaccharides sulfatés.

20

25

30

35

40

45

50

55

FIG. 1

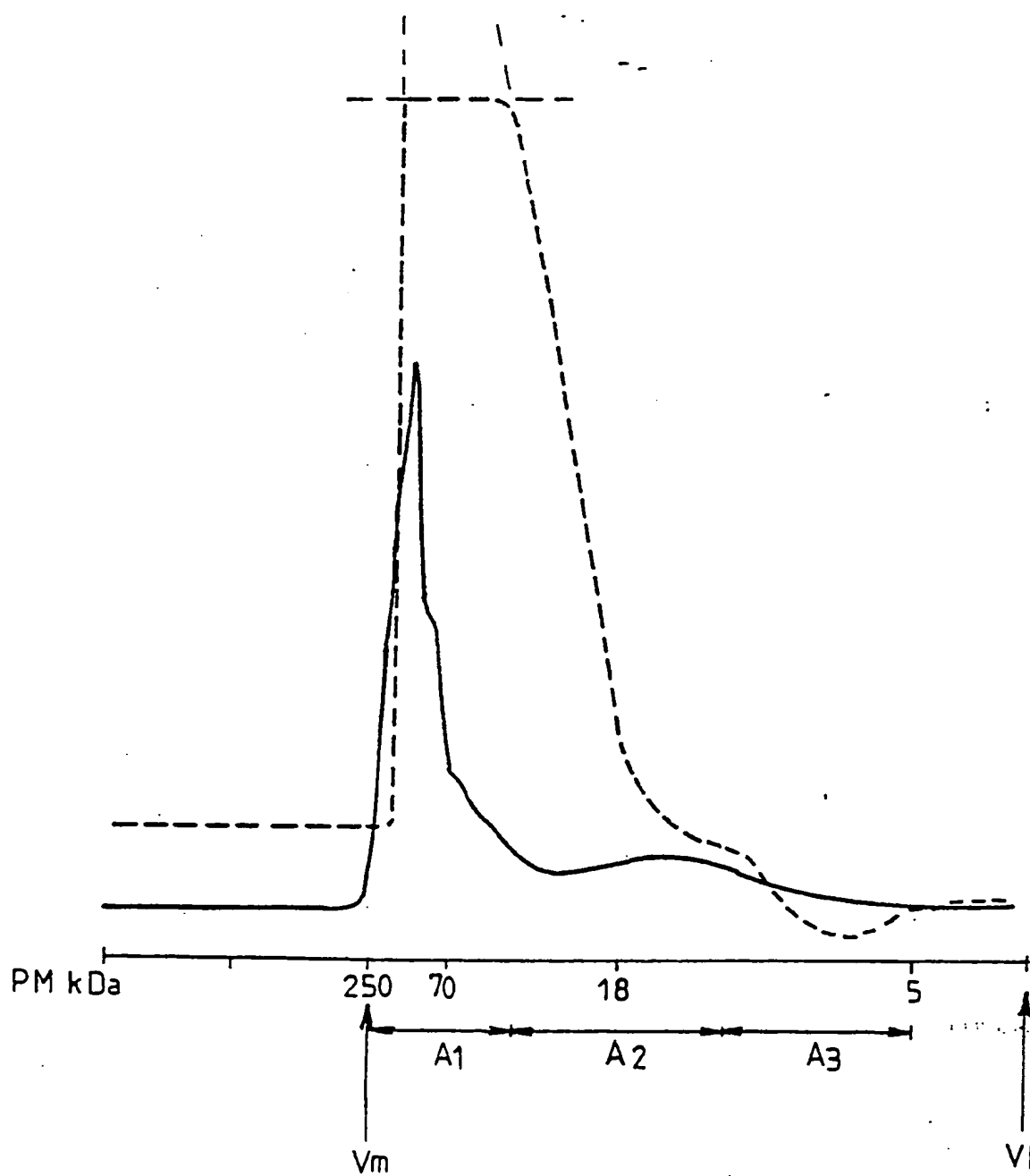
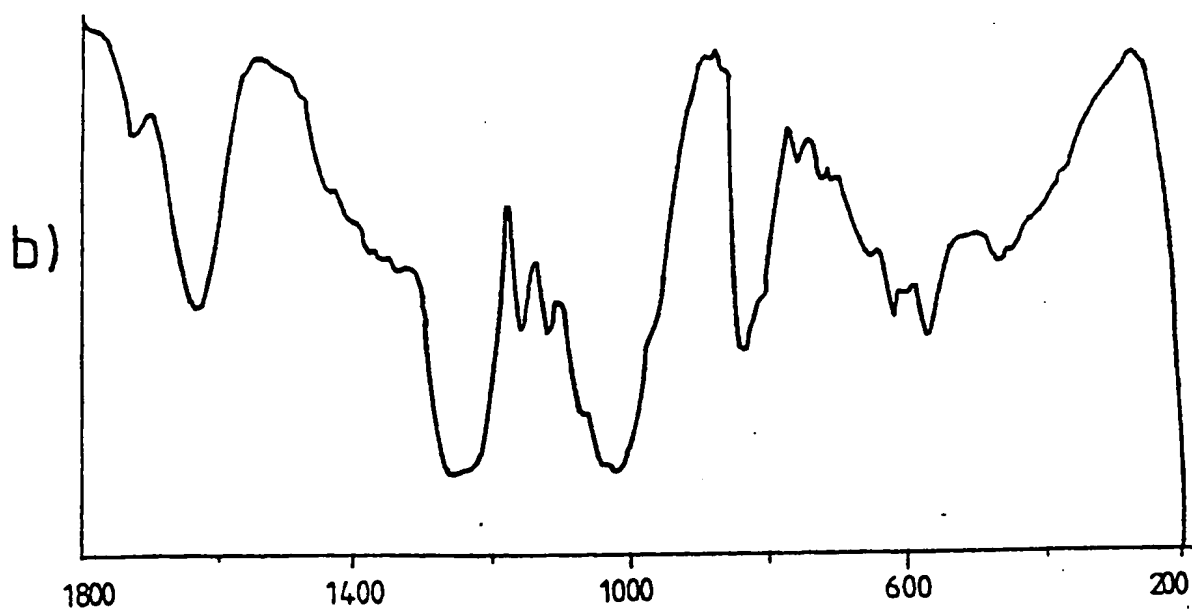
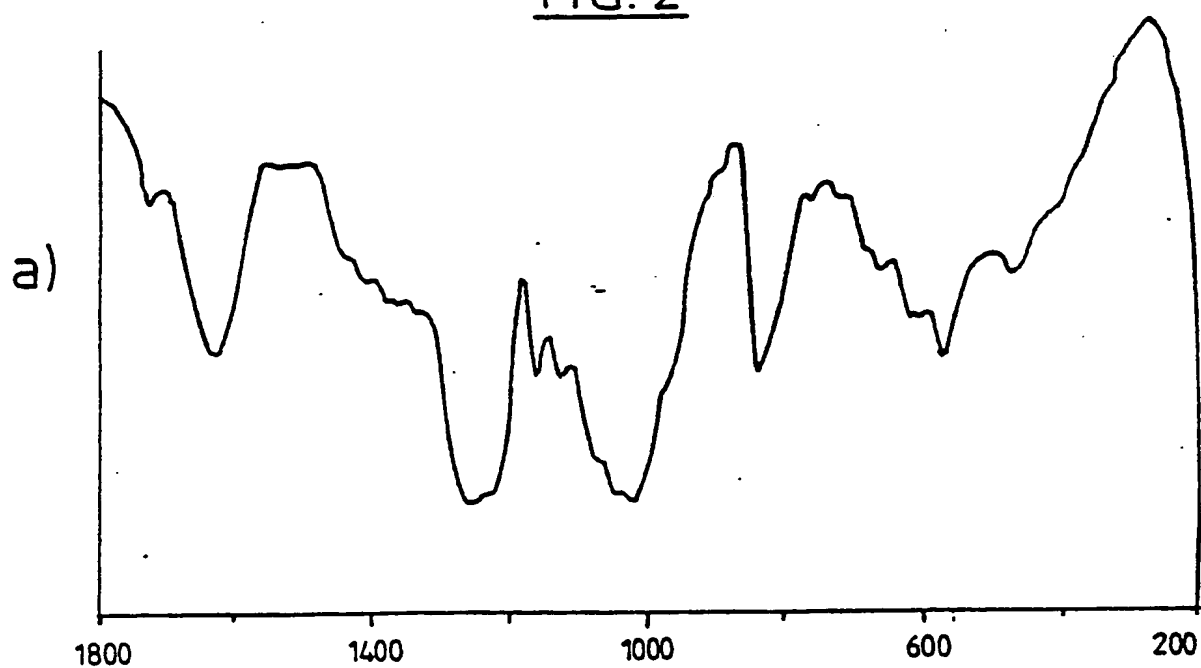


FIG. 2





Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 90 40 1636

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
D,X	GB-A- 890 207 (CIBA)(28-02-1962) * Page 1, lignes 62-71; page 2, lignes 9-10; revendications *	1-2,4, 10	C 08 B 37/00 A 61 K 31/715
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, vol. 10, no. 219 (C-363)[2275], 31 juillet 1986; & JP-A-61 057 520 (KIBUN FOOD CHEMIPHAR K.K.) 24-03-1986		
A	ACTA CHEMICA SCANDINAVICA, vol. 24, 1970, pages 3339-3352; B. LARSEN et al.: "Sulphated polysaccharides in brown algae"		
D,A	CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 186, no. 1, 15 février 1989, pages 119-129, Amsterdam, NL; T. NISHINO et al.: "Isolation, purification, and characterization of fucosecontaining sulfated polysaccharides from the brown seaweed Ecklonia kurome and their blood-anticoagulant activities"		
A	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 6, 25 février 1989, pages 3618-3623; F.C. CHURCH et al.: "Antithrombin activity of fucoidan"		
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 26-09-1990	Examinateur LENSSEN H.W.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503 01.82 (P0402)